

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»



КОРЕЦЬКА НАТАЛІЯ ІГОРІВНА

УДК 604.2:61.185 (043.3)

**БІОТЕХНОЛОГІЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ ШТАМУ
RHODOCOCUS ERYTHROPOLIS AU-1, ВЛАСТИВОСТІ ТА
ЗАСТОСУВАННЯ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Київ-2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі хімії та біотехнології горючих копалин Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України.

Науковий керівник: доктор технічних наук, професор

Карпенко Олена Володимирівна, Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України, завідувач відділу хімії та біотехнології горючих копалин

Офіційні опоненти: доктор технічних наук, старший науковий співробітник **Боднарчук Оксана Василівна**, Інститут продовольчих ресурсів НААН України, завідувач відділу аналітичних досліджень якості харчових продуктів;

кандидат технічних наук, **Щурська Катерина Олександрівна**, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, доцент кафедри екобіотехнології та біоенергетики

Захист відбудеться 11 вересня 2020 р. о 14 годині 00 хвилин на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 при Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України (03056, Україна, м. Київ, пр. Перемоги, 37, корп. 4, ауд. 258).

З дисертацією можна ознайомитися у Науково-технічній бібліотеці ім. Г.І. Денисенка Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України (03056, Україна, м. Київ, пр. Перемоги, 37).

Автореферат розісланий 7 серпня 2020 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
Д 26.002.28, д.т.н., доц.



Н.Б. Голуб

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Успішний розвиток сучасних технологій передбачає використання нових екологічно безпечних речовин, до яких належать і поверхнево-активні продукти мікробного походження (біоПАР, біосурфактанти). Висока ефективність біоПАР зумовлена поєднанням їх фізико-хімічних властивостей з біологічною активністю (поверхневою, емульгувальною активністю, стійкістю за різних температур, рН, впливом на клітинні мембрани), а також біодеградабельністю і низькою токсичністю (Banat et al., 2010; Mulligan et al., 2014; Singh et al., 2018). Серед продуцентів біоПАР значний практичний потенціал мають актинобактерії роду *Rhodococcus*, які синтезують широкий спектр важливих метаболітів – трегалозоліпідні ПАР та біополімери різної локалізації (Lu et al., 2009; Franzetti et al., 2010; Hu et al., 2020). Проте їх практичне впровадження можливе тільки за наявності ефективних технологій виробництва. Натеper промислове отримання біогенних ПАР, зокрема трегалозоліпідної природи, лімітується низьким виходом продуктів, а також значною вартістю процесів їх очищення. Створення конкурентоспроможних технологій біоПАР включає не тільки підбір активних штамів-продуцентів, а й оптимізацію біосинтезу, раціональні, економічно обґрунтовані шляхи виділення та очищення цільових продуктів (Okoliegbe and Agarry, 2012).

Отже, актуальною проблемою є розроблення ефективних маловідходних біотехнологій трегалозоліпідних ПАР (ТПАР), багатовекторне дослідження їх властивостей, що сприятиме підвищенню практичного потенціалу екологічно безпечних продуктів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є складовою частиною наукових напрямків Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л.М. Литвиненка НАН України – дослідження процесів мікробного синтезу біоПАР та їх практичного використання. Робота виконана в рамках бюджетних науково-дослідних тем: № 0107U001276 “Створення нових екологічно безпечних матеріалів на основі каротиноїдів, полісахаридів та ПАР” (2007-2011 pp.), № 0110U005055 «Фізико-хімічні основи створення вискоєфективних поверхнево-активних систем на основі біогенних ліпідів, біополімерів та їх комплексів» (2011-2015 pp.); №0119U002996 «Фізико-хімічні основи використання біогенних поверхнево-активних речовин у композиційних препаратах» (2016–2020 pp.); № 0117U004288 «Розробка наукових основ комплексної ремедіації техногенно забруднених ґрунтів» (2017-2021 pp.), а також договірних тем: № 0116U008879 «Розроблення технології біогенних поверхнево-активних речовин та композиційних біоцидних препаратів для рослинництва» (2016-2017 pp.), № 0117U001347 «Розробка біогенних інгібіторів для захисту від корозії та біокорозії нафтогазовидобувного обладнання» програми «Ресурс-2» (2016-2020 pp.), проекту Українського науково-технологічного центру та НАН України № 5965 «Створення нових інгібіторів корозії металів для нафтогазової промисловості із застосуванням екологічно безпечних поверхнево-активних

речовин» (2014-2016 рр.). Дисертантка брала участь у виконанні наведених тем як виконавець.

Мета і завдання досліджень

*Метою роботи є розроблення технології отримання метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1, визначення їх властивостей та застосування у рослинництві і для захисту металів від корозії.*

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні **задачі**:

- провести скринінг культур *R. erythropolis* на здатність до синтезу ПАР;
- опрацювати раціональні умови синтезу трегалозоліпідних ПАР та біополімерів штаму *R. erythropolis* Au-1;
- дослідити ефективність відходів олійної промисловості як економічно вигідних субстратів для синтезу продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1;
- опрацювати раціональні способи виділення цільових метаболітів *R. erythropolis* Au-1;
- розробити технологічну схему одержання продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1;
- вивчити фізико-хімічні та біологічні властивості отриманих метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1 для оцінки їх практичного потенціалу;
- розробити технології застосування продуктів *R. erythropolis* Au-1 у рослинництві та для захисту металів від корозії.

Об'єкт дослідження – біотехнології мікробного синтезу поверхнево-активних речовин.

*Предмет дослідження – біотехнологічні параметри одержання поверхнево-активних метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1, їхні функціональні властивості, застосування у рослинництві та антикорозійному захисті металів.*

Методи досліджень. Для виконання поставлених завдань використано наступні методи: мікробіологічні (культивування й аналіз мікроорганізмів, визначення антимікробної активності), хімічні (аналіз вмісту метаболітів), фізико-хімічні (визначення поверхневої, емульгувальної активності, показників критичної концентрації міцелоутворення, крайових кутів змочування), спектральні (ідентифікація метаболітів), біохімічні (вміст пігментів фотосинтезу), фізіологічні (біотести на фітогормони), математичні (визначення оптимальних екстрагентів ПАР, статистична обробка результатів), хемоінформатики (віртуальний скринінг біологічної активності з використанням програми PASS). Польові (виробничі) досліді проведено стандартними методами на полях Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН України.

Наукова новизна одержаних результатів. За результатами скринінгу вибрано новий перспективний продуцент поверхнево-активних речовин – штам *R. erythropolis* Au-1, що синтезує не тільки клітинно-зв'язані, а й позаклітинні трегалозоліпідні ПАР, а також екзополісахаридний комплекс. Вперше виділено та ідентифіковано клітинний біополімер штаму *R. erythropolis* Au-1 – полігідроксиалканоат. З використанням математичного моделювання (метод лінійних багатопараметрових рівнянь) визначено оптимальні екстрагенти ТПАР

штаму *R. erythropolis* Au-1 з культуральної рідини. Вперше показано ефективність виділення позаклітинних ТПАР шляхом сорбції багаточастиновими магніточутливими композитними адсорбентами типу «ядро-оболонка» на основі оксидів перехідних металів. Визначено, що ТПАР сприяють підвищенню проникності клітинних мембран мікроорганізмів і рослин, підсиленню активності біоцидів-тіосульфатів та ауксинових фітогормонів (індоліл-3-оцтової кислоти).

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено технологію виробництва метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1, застосування якої дозволило отримати 5 цільових продуктів та максимально використати всі компоненти постферментаційної культуральної рідини. Встановлено ефективність продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1 як регуляторів росту рослин, що підтверджено польовими експериментами. Розроблено екологічно безпечні антикорозійні препарати на основі супернатанту культуральної рідини *R. erythropolis* Au-1, їх ефективність апробовано у промислових умовах. Результати роботи використовуються у навчальному процесі і науковій роботі кафедри фізіології та екології рослин Львівського національного університету ім. І. Франка та кафедри технології біологічно активних сполук, фармації і біотехнології Національного університету «Львівська політехніка». Практичне значення одержаних результатів засвідчено відповідними актами впровадження та патентом України.

Особистий внесок здобувача. Дисертанткою проведено критичний аналіз літератури, експерименти з біосинтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1, дослідження їх властивостей. Планування й постановку експериментів, аналіз результатів проводили спільно з науковим керівником д.т.н., проф. Карпенко О.В., виділення полігідроксиалканоксиду – з к.т.н. Семенюком І.В., оптимізацію екстракції математичним методом – спільно з к.х.н., с.н.с. Мідяною Г.Г., виділення ТПАР з сорбентами – з к.б.н. Щегловою Н.С. і к.т.н. Макідо О.Ю., дослідження композицій ТПАР з біоцидами – з д.х.н., проф. Лубенець В.І. (НУ «Львівська політехніка»), інгібування корозії металів – з д.т.н. Зінем І.М. і д.т.н. Корнієм С.А. (Фізико-механічний інститут ім. Г.В. Карпенка НАН України), вплив ПАР на рослини – з к.б.н., доц. Барановим В.І. (ЛНУ ім. І. Франка), виробничі дослідження – з к.б.н. Яцук К.І. (Інститут сільського господарства Карпатського регіону НААН України). Авторка висловлює подяку к.б.н. Ногінній Т.М. (Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України) за надані для досліджень штами бактерій роду *Rhodococcus*, а також всім, хто сприяв виконанню роботи. Зазначені науковці є співавторами публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації представлені на вітчизняних та міжнародних конференціях: «Молодь та поступ біології» Львів 2009, 2013, 2014 рр.; «daRostim: Фітогормони, гумінові речовини та інші біологічно-активні сполуки для сільського господарства, здоров'я людини і охорони навколишнього середовища», Львів, 2013; «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку», Шацьк, 2013, 2014 рр.; «daRostim: Теория, практика, перспективы применения

биологически активных соединений в сельском хозяйстве», Сыктывкар, Россия, 2015; «Науково-практичні засади загально інженерної підготовки фахівців фармації», Харків, 2018 р.

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 22 наукових праці, у тому числі 10 статей у наукових фахових виданнях (з них 7 статей у вітчизняних журналах, які представлено у міжнародних наукометричних базах даних), 2 статті – в інших виданнях, патент України на корисну модель, 9 тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 6 розділів, висновків, списку використаних літературних джерел (187 найменувань) і додатка. Робота викладена на 131 сторінці тексту, містить 42 рисунки і 25 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1. Огляд літератури

У першому розділі наведено аналіз літературних даних щодо мікробних ПАР, характеристику їх базових властивостей та перспективи практичного застосування. Детально охарактеризовано метаболіти бактерій роду *Rhodococcus*, шляхи синтезу трегалозоліпідних ПАР (ТПАР), технології отримання і виділення. Розглянуто перспективи використання цінних метаболітів бактерій *Rhodococcus* у сільському господарстві, промисловості, медицині, екології.

Розділ 2. Матеріали, методи і методики досліджень

Другий розділ містить характеристику основних методів та методик досліджень. У роботі використано 9 штамів актинобактерій *Rhodococcus erythropolis*, штам *Gordonia rubripertincta* УКМ-122, фітопатогенні бактерії (*Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*) з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України; фітопатогенні гриби (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia cerealis*) – з музею ДП «Ензим». У роботі досліджували рослини – пшеницю озиму (*T. aestivum* L.) сорту Золотоколоса та сою (*Glycine max* var *slavonica* Kov. et Pinz) сорту Іванка; використовували препарати фітогормонів – ауксини (індоліл-3-оцтова кислота), багатошарові магніточутливі композитні адсорбенти типу «ядро-оболонка» на основі оксидів перехідних металів (CuO, CoO, MnO), одержані у Відділенні ФХГК ІнФОВ ім. Л.М. Литвиненка НАН України, біоциди – етилтіосульфанілат (ЕТС) й алілтіосульфанілат (АТС), синтезовані на кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації і біотехнології НУ «Львівська політехніка».

Культивування бактерій проводили на ротаційній качалці (WL-2000, JV Electronic, Poland) у колбах Ерленмейєра при 28-30°C на рідкому поживному середовищі, (г/дм³): K₂HPO₄ – 2,0; KH₂PO₄ – 2,0; MgSO₄×7H₂O – 0,5; NaNO₃ – 3,0; Na₃C₆H₅O₇×2H₂O – 1,0; дріжджовий екстракт – 1,0; джерело вуглецю – 20,0; дистильована вода – до 1 дм³. Як джерела вуглецю використовували

гексадекан, тетрадекан, сахарозу, гліцерин, вазелінову оливу, відходи промисловості (ріпаківий і соєвий фосфатидні концентрати (ФК), соняшниковий та оливковий фузи, відпрацьовану (пересмажену) соняшкову оливу, технічний гліцерин). Як джерела азоту: NaNO_3 , NH_4NO_3 , $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, пептон, дріжджовий екстракт. Біомасу бактерій визначали гравіметричним методом після відмивання клітин гексаном або дистильованою водою.

Для визначення оптимальних екстрагентів трегалозоліпідів із постферментаційної культуральної рідини використано метод лінійних багатопараметрових рівнянь (Koppel and Palm, 1973), яким опрацьовували експериментальні результати екстракції ТПАР розчинниками різної природи: гексаном, н-октаном, бензолом, толуолом, 1,2-дихлоретаном, хлороформом, тетрахлорметаном, ізобутанолом, т-бутанолом, пентанолом-2, етилацетатом, бутилацетатом, діетиловим ефіром. Для виділення клітинно-зв'язаних ПАР з біомаси бактерій використовували суміш Фолча – хлороформ-метанол 2:1 (Folch, 1957), хлороформ-ізопропанол 2:1, етанол, метанол, ізопропанол, етилацетат, гексан, хлороформ. Позаклітинні ТПАР екстрагували сумішшю Фолча, а також виділяли за допомогою сорбентів – 1,5% розчину натрій альгінату або магніточутливих композитів на основі CuO , CoO або MnO . Сорбенти відділяли з супернатанту культуральної рідини (СКР) центрифугуванням або за допомогою зовнішнього магнітного поля, ТПАР екстрагували з носіїв.

Якісний аналіз ТПАР проводили методом ТШХ (Kretschmer, 1983; Лионг, 2017), структуру вивчали методами ІЧ-спектроскопії (Thermo scientific Nicolet iZ10, США). Клітинно-зв'язані ТПАР розділяли на фракції із застосуванням колонкової хроматографії (скляна колонка 220x15 мм з силікагелем 60, ROSS, Бельгія) (Smyth, 2010).

Екзополісахаридний комплекс (ЕПК) виділяли шляхом осадження із СКР етанолом (Williams, 1977), вміст вуглеводів визначали за Дюбуа (Dubois, 1956), білка – за Бредфорд (Bradford, 1976), ліпідів – гравіметричним методом після екстракції сумішшю Фолча. Для виділення полігидроксиалканоату (ПГА) клітини обробляли ультразвуком (УЗМ 001), екстрагували хлороформом в апараті Сокслета (Семенюк, 2019). Для ідентифікації ПГА використовували ТШХ (Senthilkumar, 2016), спектроскопію: UV-Vis (Sato, 2015), інфрачервону (ІЧ) та ядерного магнітного резонансу (ЯМР).

Поверхневий натяг (ПН) супернатантів культуральної рідини, розчинів ТПАР визначали методом Дю-Нуї з платиновим кільцем (Абрамзон, 1988) на тензіометрі KRÜSS K6 (Krüss GmbH, Німеччина), критичні концентрації міцелоутворення (ККМ) – за ізотермами ПН розчинів ПАР. Емульгувальну здатність оцінювали за індексом емульгування E_{24} (Gutnick, 1988) з вазеліною оливою. Крайові кути змочування визначали на катетометрі КМ-8. Термічну стабільність ТПАР і ПГА досліджували на дериватографі Q-1500D системи “Паулік - Паулік - Ердей” (інтервал температур 20-1000°C, еталон – алюміній оксид).

Цитотоксичність ПАР визначали за мінімальною концентрацією, яка спричиняла загибель 50% культур клітин L929 і A549. Дію ТПАР на проникність клітинних мембран бактерій оцінювали за кількістю вивільненого білка (Vasileva-Tonkova, 2005), чисельність життєздатних клітин – методом серійних розведень (Сегі, 1983), антимікробну активність – за зонами затримки росту тест-культур на агаризованому середовищі (Сегі, 1983) або за мінімальною інгібувальною (МІК) та бактерицидною (МБК) концентраціями. Вплив ТПАР на активність фітогормонів–ауксинів вивчали у біотестах на колеоптилях пшениці (Кефели, 1973). Здатність *R. erythropolis* Au-1 до синтезу ауксинів оцінювали реакцією Сальковського (Кефели, 1973). Вплив ТПАР на поглинання рослинами іонів калію і кальцію оцінювали за зміною їх кількості у середовищі росту на полум'яному фотометрі ПФМ-ЗОМЗ.

Дію метаболітів *R. erythropolis* Au-1 на ріст рослин оцінювали шляхом допосівного оброблення насіння розчинами ТПАР, ЕПК, СКР; схожість і морфометричні показники проростків за ДСТУ 4138-2002. Вміст пігментів фотосинтезу у листі рослин визначали на фотоколориметрі КФК-3, використовуючи формули Венштейна (Шлик, 1971). У польових умовах вирощували сою та пшеницю до стадії збору врожаю (Доспехов, 1985; Трибель, 2002); урожайність культур та масу насіння визначали за ГОСТ 10842–89.

Здатність препаратів на основі метаболітів *R. erythropolis* Au-1 до інгібування корозії металів вивчали гравіметричним методом (Слободян та ін., 2012) та методом потенціодинамічної поляризації на потенціостаті Gill AC. Для статистичного аналізу використовували варіаційну статистику (Лакін, 1990), програму Excel 2010.

Розділ 3. Синтез метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1

У роботі представлено результати скринінгу 9 штамів актинобактерій *R. erythropolis* на здатність до синтезу ПАР. Обрано штам *R. erythropolis* Au-1 (*R. erythropolis* УКМ Ас-603), який є активним продуцентом позаклітинних і клітинно-зв'язаних ПАР, а також емульгатора – екзополісахаридного комплексу.

Характеристика метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1. Методом ТШХ визначено, що до складу комплексу клітинно-зв'язаних ТПАР *R. erythropolis* Au-1 входять: гліколіпіди, а саме трегалозоліпіди (трегалозо-6-міколати, трегалозо-6,6'-диміколати, трегалозо-6-ацилати, трегалозо-6,6'-діацилати), пептидоліпіди, а також неполярні ліпіди (цетиловий спирт, пальмітинова кислота, тригліцериди). Зокрема, методом ІЧ-спектроскопії підтверджено біосинтез важливого поверхнево-активного компонента – трегалозо-6,6'-диміколата.

Особливістю штаму *R. erythropolis* Au-1 є здатність до синтезу не тільки клітинно-зв'язаних, а й позаклітинних ПАР. Залежно від джерела вуглецю їх вихід становив від 0,45 г/дм³ (на сахарозі) до 2,54 г/дм³ (на ріпаковому ФК). Встановлено, що до складу позаклітинних ТПАР входять трегалозоліпіди (трегалозомоно- і диміколати, трегалозомоно- і діацилати) та неполярні ліпіди (тригліцериди, цетиловий спирт, пальмітинова кислота).

Важливим позаклітинним метаболітом штаму *R. erythropolis* Au-1 є емульгатор – екзополісахаридний комплекс, який містить полісахариди (90,2%), ліпіди (9,3%), білки (0,5%). Методом ІЧ-спектроскопії підтверджено полісахаридну основу ЕПК, а також наявність у його складі -NH- груп, що узгоджується з даними літератури (Urai et al., 2007). Показано, що ЕПК є активним емульгатором – Е₂₄ розчинів (1-10 г/дм³) щодо вазелінової оливи становили 42-58%, емульсії були стабільними упродовж 3 тижнів.

Уперше отримано й охарактеризовано клітинний полімер штаму *R. erythropolis* Au-1, що належать до біодеградабельних природних поліестерів. Відомо, що такі сполуки містяться у клітинах бактерій у вигляді гранул для зберігання енергії (Гудзь та ін., 2014). Одержаний біополімер ідентифіковано як полігидроксиалканоат методами ТІХ, UV-Vis, ІЧ- і ЯМР-спектроскопії. Його вихід становив 10% від сухої маси клітин, температура плавлення – 42°C.

Також вперше встановлено здатність штаму *R. erythropolis* Au-1 до синтезу позаклітинних фітогормонів ауксинової природи, що визначено за реакцією Сальковського.

Раціональні умови синтезу ПАР штаму *R. erythropolis* Au-1. Однією із важливих умов ефективного синтезу цільових продуктів є вибір раціональних джерел вуглецю та азоту. Досліджено синтез ПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 на середовищах з гідрофобними або гідрофільними субстратами (табл.1).

Таблиця 1

**Вплив джерел вуглецю на вихід і властивості метаболітів
штаму *R. erythropolis* Au-1**

Джерела вуглецю	АСБ, г/дм ³	Трегалозоліпідні ПАР, г/дм ³		Екзополісахаридний комплекс, г/дм ³	Поверхневий натяг СКР, мН/м
		Клітинно-зв'язані	Позаклітинні		
Сахароза	6,2±0,3	0,50±0,02	0,45±0,02	5,04±0,23	53,0±2,1
Гліцерин	5,8±0,3	0,42±0,02	0,81±0,04	4,52±0,21	50,5±2,0
Вазелінова олива	8,5±0,4	2,53±0,12	1,50±0,07	3,00±0,14	45,4±1,9
Тетрадекан	11,5±0,6	2,71±0,13	1,05±0,05	1,94±0,10	37,1±1,5
Гексадекан	10,3±0,5	3,40*±0,16	1,00±0,05	2,20±0,11	37,0±1,5

Примітки: джерела вуглецю – в еквімолярних концентраціях за вуглецем – 17 г/дм³; джерело азоту – натрій нітрат (3 г/дм³ – еквівалент 0,49 г/дм³ N); АСБ – абсолютно суха біомаса; * – результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Встановлено, що для синтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 доцільно використовувати гідрофобні джерела вуглецю (вихід клітинно-зв'язаних ТПАР становить 2,5-3,4 г/дм³, позаклітинних – 1,0-1,5 г/дм³), найкращим субстратом є гексадекан (20 г/дм³). Проте, найбільший вихід ЕПК отримано на середовищах з сахарозою або гліцерином (4,5-5,0 г/дм³), що у 2 рази більше, ніж на гексадекані.

Також було визначено вплив природи джерел азоту на синтез метаболітів *R. erythropolis* Au-1 (табл.2). Максимальний вихід трегалозоліпідних ПАР –

4,4 г/дм³ отримано на середовищі з натрій нітратом, що на 13-20% більше, ніж з дріжджовим екстрактом, амоній нітратом або сечовиною.

Таблиця 2

Вплив джерел азоту на вихід метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1

Джерело азоту	АСБ, г/дм ³	Трегалозоліпідні ПАР, г/дм ³		Екзополісахаридний комплекс, г/дм ³	Поверхневий натяг СКР, мН/м
		Клітинно-зв'язані	Позаклітинні		
NaNO ₃	10,3±0,5	3,40*±0,16	1,00±0,05	2,20±0,11	37,0±1,5
CO(NH ₂) ₂	8,8±0,4	2,81±0,14	1,10±0,06	1,91±0,10	37,5±1,5
NH ₄ NO ₃	9,1±0,5	2,72±0,14	1,00±0,05	2,01±0,10	37,5±1,6
пептон	5,7±0,3	0,81±0,04	0,32±0,02	0,92±0,04	38,5±1,4
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,5±0,2	0,50±0,02	0,21±0,01	0,81±0,04	39,0±1,7
дріжджовий екстракт	12,4±0,6	3,02±0,15	1,12±0,06	2,42±0,12	38,5±1,6

Примітки: джерела азоту – в еквімолярних концентраціях за азотом – 0,49 г/дм³; джерело вуглецю – гексадекан (20 г/дм³); АСБ – абсолютно суха біомаса; * – результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Отже, обгрунтовано доцільність застосування гексадекану (20 г/дм³) та натрій нітрату (3 г/дм³) в якості джерел вуглецю й азоту для синтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1.

Апробація біосинтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 у ферментері. Важливим завданням є масштабування технології біоПАР від лабораторного до виробничого процесу, зокрема апробування у біореакторі (Пирог та ін., 2011). Вивчено динаміку синтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 на розробленому середовищі у біореакторі з вихровою системою аерації, ефективність якого для різних біоПАР визначено у попередніх роботах (Карпенко та ін., 2012).

Після 120 год ферментації отримано 15,2 г/дм³ АСБ, 4,8 г/дм³ клітинно-зв'язаних і 1,5 г/дм³ позаклітинних ТПАР, що на 41-50% перевищує вихід продуктів порівняно із культивуванням у колбах (рис. 1).

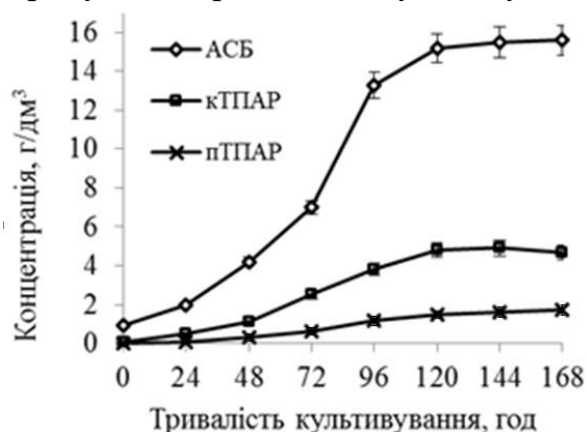


Рис. 1. Динаміка синтезу трегалозоліпідних ПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 у ферментері: АСБ – абсолютно суха біомаса; κТПАР – клітинно-зв'язані трегалозоліпідні ПАР; пТПАР – позаклітинні трегалозоліпідні ПАР.

Отже, показано доцільність використання біореактора з вихровою системою аерації для біосинтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1.

Відходи промисловості для отримання продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1. Для здешевлення біотехнології метаболітів *R. erythropolis* Au-1 в якості

джерел вуглецю випробувано відходи олійної промисловості: соєвий і ріпаковий фосфатидний концентрати, соняшниковий й оливковий фузи, відпрацьовану соняшникову олію, технічний гліцерин (табл.3).

Таблиця 3

Синтез ПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 на відходах олійної промисловості

Джерела вуглецю	АСБ, г/дм ³	Трегалозоліпідні ПАР, г/дм ³		ЕПК, г/дм ³	Поверхневий натяг СКР, мН/м	Емульгувальна активність СКР E ₂₄ , %
		Клітинно-зв'язані	Позаклітинні			
Соняшниковий фуз	10,2±0,5	1,51±0,07	2,40±0,12	4,5±0,2	45,5±1,8	36,6±1,8
Ріпаковий ФК	10,1±0,5	1,40±0,07	2,51±0,12	9,5*±0,5	48,5±1,9	60,6±3,0
Соєвий ФК	11,0±0,5	1,62±0,08	2,60±0,13	6,6±0,3	44,0±1,6	51,7±2,3
Оливковий фуз	11,7±0,6	1,52±0,06	2,52±0,13	2,9±0,1	44,5±1,7	35,0±1,7
Відпрацьована соняшникова олія	11,4±0,6	1,71±0,09	2,50±0,12	7,5±0,4	48,8±0,9	57,8±2,8
Технічний гліцерин	2,3±0,1	0,80±0,04	-	-	31,0±1,2	-

Примітки: АСБ – абсолютно суха біомаса; ЕПК – екзополісахаридний комплекс; ФК – фосфатидний концентрат; субстрати – в еквімолярних концентраціях за вуглецем (17 г/дм³); * – результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Показано, що практично всі випробувані субстрати, окрім технічного гліцерину, дозволяють отримати високі виходи трегалозоліпідних ПАР (1,4-2,6 г/дм³) та ЕПК (2,9-9,5 г/дм³).

Встановлено, що при біосинтезі ПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 на відходах олійної промисловості у їх складі збільшувалася кількість фосфатидів і жирних кислот. У результаті на середовищі з ріпаковим ФК поверхневий натяг СКР підвищувався до 48,5 мН/м (на гексадекані – 37,0 мН/м). Вихід ЕПК був більше практично у 2 рази, при чому в його складі зростав вміст ліпідів (на 17,3%) і білків (на 2%). Індекс емульгування ЕПК (1 г/дм³) досягав 46%.

Отже, продукти, отримані на відходах олійної промисловості, є перспективними для застосування, зокрема у рослинництві.

Способи виділення ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1. Важливою технологічною стадією, яка визначає собівартість цільових продуктів біосинтезу, є їх виділення та очистка. Особливо цінними продуктами штаму *R. erythropolis* Au-1 є клітинно-зв'язані та позаклітинні ТПАР. Експериментальні дані з екстракції ТПАР розчинниками різної природи обчислено згідно з принципом лінійності вільних енергій (за модифікованим багатопараметровим рівнянням Коппеля-Пальма), що дозволило встановити залежність між розчинністю ТПАР із властивостями екстрагентів. Аналіз даних показав, що ефективність екстракції ТПАР визначається здатністю розчинників до неспецифічної сольватації, яка залежить від їх поляризованості і полярності.

Показано, що оптимальними екстрагентами ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 є розчинники, які проявляють високу поляризовуючу здатність (діетиловий ефір, ізобутанол).

Опрацьовано раціональні способи виділення трегалозоліпідних ПАР різної локалізації із постферментаційної культуральної рідини штаму *R. erythropolis* Au-1:

1. Сепарація біомаси з наступною екстракцією клітинно-зв'язаних ТПАР.
2. Сорбція позаклітинних ТПАР на носіях різної природи, їх подальша сепарація з СКР та екстракція продуктів.

Найбільшу кількість клітинно-зв'язаних ТПАР отримано при екстракції з відсепарованої біомаси сумішами хлороформ-ізопропанол 2:1 або хлороформ-метанол 2:1 (0,31 і 0,33 г ТПАР/г АСБ відповідно). Проте, встановлено (методом ТШХ), що більш селективним екстрагентом трегалозоліпідів є етанол – отримано 0,29 г ТПАР/г АСБ, що є на 17-34% більше, ніж за використання гексану, ізопропанолу, етилацетату, хлороформу, метанолу. Враховуючи, що вартість етанолу є на 30-45% нижчою, обґрунтовано його доцільність як економічно доступного і безпечного екстрагента ТПАР.

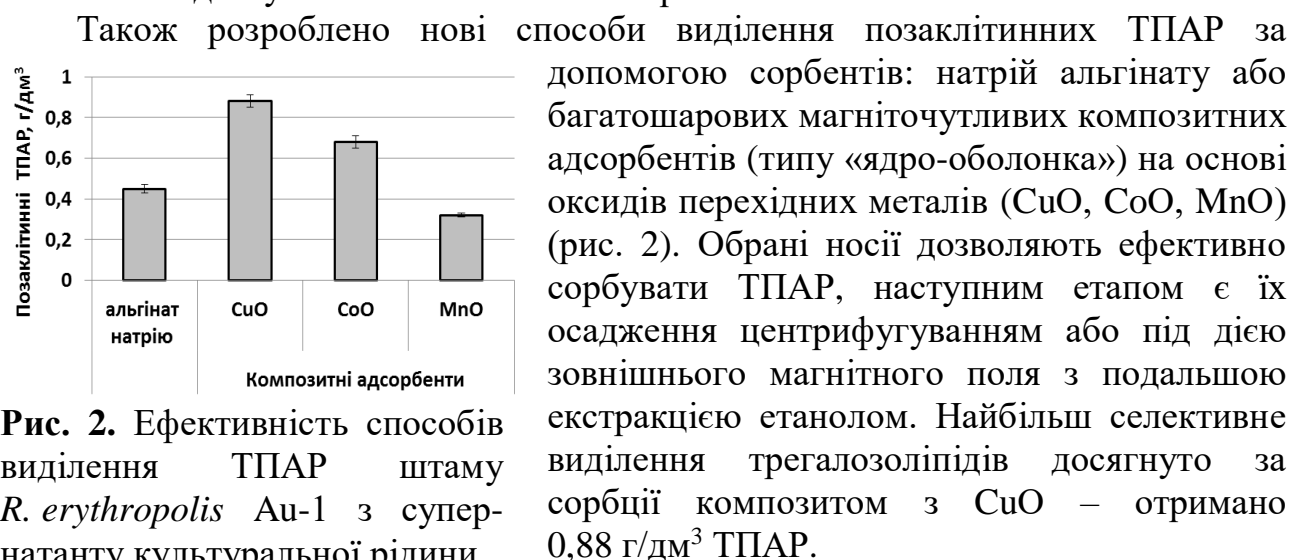


Рис. 2. Ефективність способів виділення ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 з супернатанту культуральної рідини.

Отже, запропоновано новий ефективний спосіб виділення позаклітинних ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 – сорбція магніточутливими композитними адсорбентами на основі оксидів металів з подальшою екстракцією.

Розділ 4. Технологія одержання ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1

Одержані результати стали підґрунтям для розроблення технології виробництва цільових продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1. Новизною біотехнології є одержання 5 товарних форм: супернатанту культуральної рідини, клітинно-зв'язаних ТПАР, позаклітинних ТПАР, екзополісахаридного комплексу, полігідроксиалканоату. Наведено апаратурно-технологічні схеми отримання продуктів, основні етапи їх одержання складаються із приготування посівного матеріалу, культивування у ферментері, сепарації біомаси, осадження, екстракції та сушіння позаклітинних ТПАР з СКР, екстракції, сушіння клітинно-зв'язаних ТПАР, осадження та сушіння ЕПК, виділення ПГА з відпрацьованої біомаси.

Фрагмент технологічної схеми наведено на рис. 3. Схема може бути реалізована на стандартному біотехнологічному обладнанні.



Рис. 3. Фрагмент технологічної схеми процесу виробництва біоПАР штаму *R. erythropolis* Au-1: КР – культуральна рідина, кТПАР – клітинно-зв’язані ТПАР, пТПАР – позаклітинні ТПАР; ЕПК – екзополісахаридний комплекс; ПГА – полігідроксиалканоат.

Особливістю технології є використання ферментера з вихровою системою аерації, який є ефективним для малотонажного виробництва ПАР, що було показано раніше (Карпенко та ін., 2012).

Проведено SWOT-аналіз, який використовують для стратегічного планування при впровадженні нових продуктів і технологій. Показано переваги отриманих біоПАР перед синтетичними: висока ефективність, термостійкість, біодеградабельність, низька токсичність, можливість синтезу на відновлювальній сировині. Прогнозована вартість препарату СКР (на гексадекані) становить 147 грн/дм³, клітинно-зв'язаних ТПАР – 39,8 грн/г, позаклітинних – 45,1 грн/г. Вартість комерційних біоПАР – рамноліпідів (Biofilon, AGAE Technologies) становить 15-1600 USD/кг (420-44 800 грн/кг) залежно від форми випуску. Натепер у світі виробництво трегалозоліпідних ПАР у промислових масштабах не налагоджено і потребує раціональних технологічних рішень.

Розроблена технологія є підґрунтям для маловідходного виробництва продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1, оскільки дозволяє максимально використовувати компоненти постферментативної культуральної рідини, а відтак мінімізувати негативний вплив виробництва на навколишнє середовище.

Розділ 5. Фізико-хімічні та біологічні властивості ПАР штаму *R. erythropolis* Au-1

Дослідження фізико-хімічних та біологічних властивостей продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1 є основою для наукового обґрунтування їх застосування у різних галузях промисловості і сільського господарства.

Фізико-хімічні властивості. Встановлено, що трегалозоліпідні ПАР є ефективними поверхнево-активними речовинами. Так, поверхневий натяг розчинів клітинно-зв'язаних ТПАР (0,5 г/дм³) становить 35 мН/м, позаклітинних – 36 мН/м; критична концентрація міцелоутворення – 0,317 г/дм³ і 0,521 г/дм³ відповідно. ТПАР покращують змочування поверхонь різних матеріалів (кути змочування оргскла, фторопласту, сталі на 10-27% менші порівняно з водою). Визначено, що серед складників ТПАР, отриманих методом колонкової хроматографії, найбільш ефективними є фракції трегалозоліпідів. Поверхневий натяг їх розчинів (0,5 г/дм³) становив 30,5-40,2 мН/м. Вперше здійснено термічний аналіз ТПАР і ПГА штаму *R. erythropolis* Au-1, що дозволило не тільки визначити їх термічну стійкість, але й охарактеризувати процеси, які проходять при нагріванні. Встановлено, що ТПАР є термічно стійкими до 130°C, а ПГА – до 175°C. Ці результати мають наукове і практичне значення, оскільки дають нову інформацію про властивості біоПАР, а також розширюють можливості їх застосування.

Визначено фізико-хімічні характеристики СКР штаму *R. erythropolis* Au-1, які свідчать, що він належить до ефективних ПАР: залежно від субстрату поверхневий натяг становив 37-50 мН/м, емульгувальна активність – 35-61%, крайові кути змочування різних матеріалів зменшувались на 21-24% порівняно з водою. Такі властивості СКР пояснюються сумісною дією його активних складників – ТПАР і ЕПК. Супернатант культуральної рідини є найбільш

економічно доступним препаратом порівняно з ТПАР або ЕПК, оскільки процес його отримання складається із меншої кількості технологічних стадій.

Отже, визначені фізико-хімічні характеристики метаболітів *R. erythropolis* Au-1 вказують на їх перспективність як сучасних екологічно безпечних продуктів, перспективних на заміну синтетичних ПАР.

Біологічні властивості ТПАР. Для раціонального застосування отриманих ТПАР досліджено також їх біологічні властивості.

Практично важливою властивістю ПАР є вплив на проникність біологічних мембран. Показано, що після оброблення суспендованих клітин тестових бактерій *A. tumefaciens* і *P. syringae* розчинами ТПАР (0,01-0,05 г/дм³) кількість позаклітинного білку зростала на 10-18%, життєздатність клітин практично не змінювалася.

Також встановлено вплив ТПАР на проникність клітинних мембран рослин – у тестах на поглинання іонів K^+ та Ca^{2+} проростками рослин. Здатність до сорбції мінеральних елементів оцінювали за залишковою кількістю іонів K^+ і Ca^{2+} у рідкому поживному середовищі (рис.4).

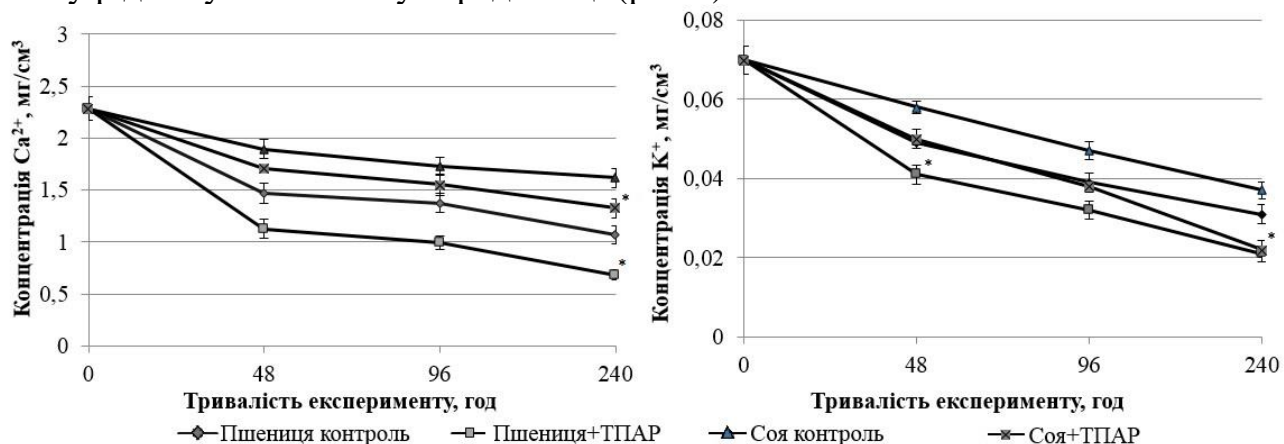


Рис. 4. Залишковий вміст іонів K^+ і Ca^{2+} у середовищі росту рослин після допосівного оброблення насіння розчином ТПАР (0,05 г/дм³): контроль – вода; * – результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Показано, що попереднє оброблення насіння розчинами ТПАР сприяло збільшенню поглинання іонів кальцію та калію корінням проростків сої на 10-40% щодо контролю, пшениці – на 16-36%. Визначено раціональну концентрацію ТПАР – 0,05 г/дм³.

Встановлений вплив трегалозоліпідних ПАР на клітини мікроорганізмів і рослин може бути поясненням механізму регулювання мембранного транспорту та підсилення дії біологічно активних речовин. Ця властивість є основою для створення ефективних композицій за участі біоПАР.

ТПАР у композиційних препаратах. Встановлено, що завдяки своїм властивостям ТПАР сприяють підвищенню антимікробної дії тіосульфатів (рис. 5, а). Так, у композиціях ТПАР (0,05 г/дм³) з біоцидом-етилтіосульфатом його мінімальні інгібувальна й бактерицидна концентрації щодо тестових бактерій зменшувалися на 20-50%.

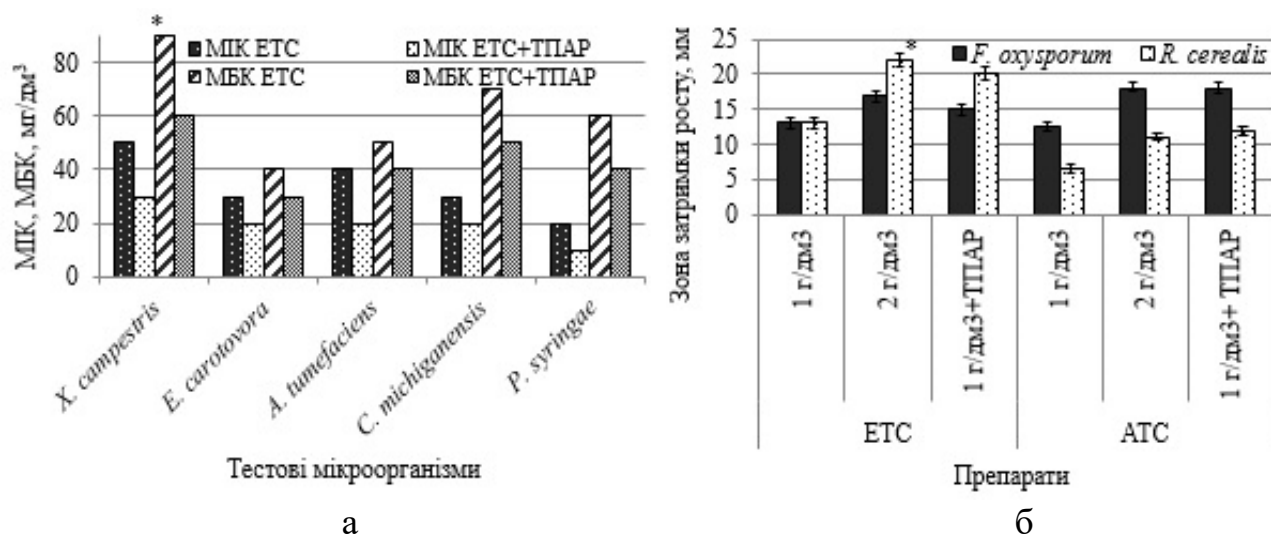


Рис. 5. Антибактеріальна (а) та фунгіцидна (б) активність композицій ТПАР з тіосульфонатами: ЕТС – етилтіосульфанілат; ТПАР – 0,05 г/дм³; МІК – мінімальна інгібувальна концентрація; МБК – мінімальна бактерицидна концентрація; * – результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Підсилювалась також фунгіцидна дія тіосульфонатів: діаметри зон інгібування росту тестових грибів зростали на 30-70% (рис. 5, б). Це дозволяє значно зменшити активні дози біоцидів у композиційних препаратах з ТПАР.

Показано також доцільність створення композиційних регуляторів росту рослин на основі ТПАР і фітогормонів. У біотестах на відрізках колеоптилів пшениці (оцінка активності ауксинових фітогормонів) встановлено підсилення дії індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) за впливу ТПАР. Для композиції ІОК (10^{-4} М) з ТПАР (0,05 г/дм³) приріст відрізків колеоптилів був на 19 % більшим, ніж у варіанті без ТПАР, і наближувався до дії ІОК (10^{-3} М).

Вплив ТПАР на ріст актинобактерій. Виявлено, що додавання ТПАР (0,05 г/дм³) до поживного середовища бактерій *R. erythropolis* Au-1 та *G. rubripertincta* УКМ-122 сприяє приросту біомаси та виходу продуктів на 13,9 і 17,0% відповідно. Це можна пояснити збільшенням біодоступності компонентів поживного середовища за присутності ТПАР, зокрема шляхом диспергування гідрофобних сполук (Singh et al., 2018).

Токсичність ТПАР. Показано, що цитотоксичні дози ТПАР щодо тестових культур клітин (аденокарциноми легень А549 та фібробластоподібних клітин мишей L929) становили 0,477-0,541 г/дм³, це свідчить, що ТПАР є менш токсичними, ніж синтетичний ПАР натрій додецилсульфат (0,008-0,010 г/дм³) або біогенні рамноліпідні ПАР (0,013-0,188 г/дм³).

Отже, ТПАР є ефективними та низько токсичними поверхнево-активними речовинами, що створює перспективи їх практичного застосування у складі екологічно безпечних препаратів різного призначення.

Розділ 6. Практичне застосування трегалозоліпідних ПАР

Встановлено ефективність практичного застосування метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1 при вирощуванні зернових та бобових культур. Також

вперше показано можливість застосування ТПАР як екологічно безпечних антикорозійних препаратів.

Продукти штаму *R. erythropolis* Au-1 для рослинництва. Стимулювальну дію ТПАР на ріст рослин показано у лабораторних і польових експериментах. Встановлено раціональну концентрацію ТПАР – 0,05 г/дм³ та ефективність різних способів допосівного оброблення насіння: замочування та обприскування розчинами ТПАР. Визначено, що СКР є препаратом з найбільшою рістстимулювальною дією для пшениці: надземна й коренева маса рослин були відповідно на 15% і 26% більшими, ніж за впливу ТПАР, та на 28% і 50% – за дії ЕПК (рис.6).

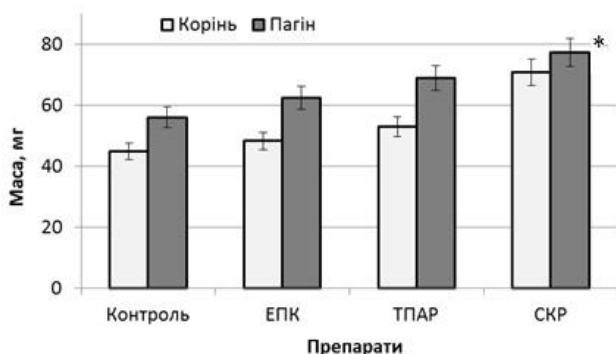


Рис. 6. Вплив метаболітів *R. erythropolis* Au-1 на ростові показники пшениці: контроль – вода; СКР (1:10, на сахарозі); ТПАР – 0,05 г/дм³; ЕПК – 0,5 г/дм³; * – результати достовірні за $p \leq 0,05$.

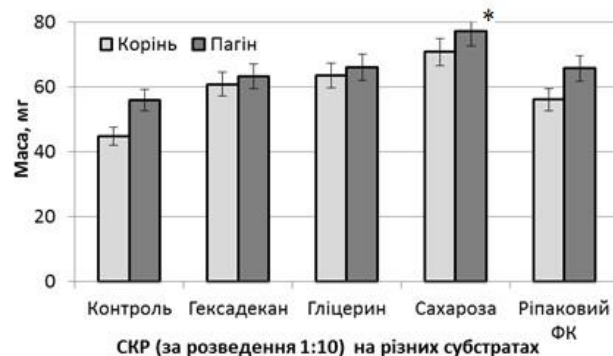


Рис. 7. Вплив СКР штаму *R. erythropolis* Au-1, отриманих на різних субстратах, на ріст пшениці: РФК – ріпаковий фосфатидний концентрат; * – результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Оброблення насіння препаратами СКР, одержаними на різних субстратах, сприяло збільшенню ростових параметрів пшениці на 20-58% щодо контролю. (рис.7), проте найкращий результат отримано за використання сахарози (1:10). Такі результати можна пояснити синергічною дією компонентів постферментаційної СКР, зокрема, ТПАР, ЕПК та ауксинових фітогормонів (Пирог та ін., 2016).

У вегетаційних і дрібноділянкових дослідженнях підтверджено стимулювальну дію ТПАР на рослини. Маса пагонів і коренів сої (вегетаційний дослід) зростала на 36,8% і 29% відповідно, а пшениці (дрібноділянковий дослід) – на 28% і 20 % щодо контролю. Допосівне оброблення насіння розчинами ТПАР сприяло збільшенню вмісту пігментів фотосинтезу у листі в середньому на 31%.

Апробацію ефективності ТПАР при вирощуванні сої та пшениці проведено в умовах виробничого дослідження на полях Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН України у 2013-2014 рр. (табл. 5). Показано, що допосівне оброблення насіння розчинами ТПАР сприяло приросту маси зерна пшениці на 9%, бобів сої – на 11% порівняно з контролем, а урожайність культури зросла на 18-21%.

Вплив ТПАР на урожайність сої і пшениці

Рослина	Варіанти оброблення насіння	Маса 1000 насінин, г	Урожайність	
			т/га	%
Соя сорту Іванка	Контроль (Вода)	140,6±5,0	1,46±0,09	100,0
	ТПАР 0.05 г/дм ³	156,1±5,8	1,73*±0,11	118,2
Пшениця сорту Золотоколоса	Контроль (Вода)	46,3±1,1	2,87±0,17	100,0
	ТПАР 0.05 г/дм ³	50,6±1,3	3,48*±0,21	121,3

Примітки: ТПАР – трегалозоліпідні ПАР, 0,05 г/дм³; * – результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Отже, препарати на основі метаболітів *R. erythropolis* Au-1 мають значні перспективи практичного застосування у рослинництві як безпечні та ефективні регулятори росту рослин.

Продукти штаму *R. erythropolis* Au-1 як інгібітори корозії металів.
Вперше встановлено можливість використання метаболітів *R. erythropolis* Au-1 (СКР, ТПАР, ЕПК) як екологічно безпечних інгібіторів корозії металів. Показано, що ці продукти інгібують корозію вуглецевої сталі та алюмінієвого сплаву в 0,1% розчині NaCl, синтетичному кислому дощі, пластовій воді, ступінь захисту – 45-97%. За результатами квантово-хімічних розрахунків механізмом інгібування корозії, ймовірно, є адсорбція молекул біоПАР на поверхні металу з утворенням бар'єрної плівки. Розроблено синергічні антикорозійні композиції на основі метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1 з синтетичним інгібітором цинк фосфатом. Методом потенціодинамічної поляризації показано, що в середовищі, інгібованому композицією, потенціал корозії сталі найбільше зміщується в позитивну сторону, а швидкості електродних реакцій та густина струму саморозчинення металу є найменшими (рис. 8).

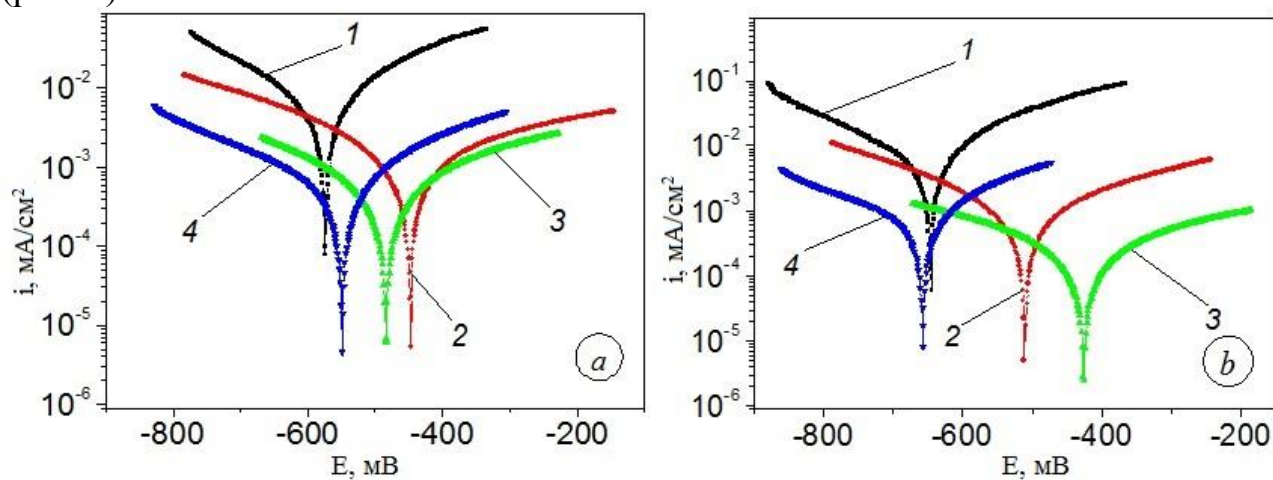


Рис. 8. Поляризаційні криві сталі Ст3 після витримки 24 год (а) та 96 год (b) у синтетичному кислому дощі: 1 – неінгібований розчин; 2 – 0,25 г/дм³ ТПАР; 3 – 0,25 г/дм³ ТПАР+0,06 г/дм³ цинк фосфату; 4 – 0,06 г/дм³ цинк фосфату.

Встановлено, що розроблені композиції є ефективними і безпечними для довкілля інгібіторами корозії, оскільки забезпечують високий ступінь захисту

вуглецевої сталі за різних температур у пластовій воді – 88-95% (патент України № 136578, 2019).

Отже, метаболіти штаму *R. erythropolis* Au-1 завдяки поліфункціональним властивостям, низькій токсичності та біодеградабельності є перспективними як самостійні продукти, а також як складові комплексних препаратів для сучасних технологій промисловості та сільського господарства.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі обґрунтовано і практично розв'язано важливе науково-технологічне завдання – розроблення біотехнології поверхнево-активних продуктів актинобактерій *R. erythropolis* Au-1, встановлення їх фізико-хімічних і біологічних властивостей та напрямків практичного застосування. Зокрема:

1. У результаті скринінгу культур *R. erythropolis* обрано штам *R. erythropolis* Au-1 – перспективний продуцент клітинно-зв'язаних і позаклітинних трегалозоліпідних ПАР, екзополісахаридного комплексу. Вперше виділено клітинний біополімер, який ідентифіковано як полігідроксиспирт. Розроблено раціональний склад поживного середовища та проведено апробацію синтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 у біореакторі з вихровою системою аерації. У результаті вихід цільових продуктів зріс на 41-50%: клітинно-зв'язаних ТПАР – до 4,8 г/дм³, а позаклітинних ТПАР – до 1,5 г/дм³.

2. Встановлено доцільність застосування відходів олійної і харчової промисловості, зокрема, фосфатидних концентратів, фузів, відпрацьованої олії як дешевих субстратів для синтезу метаболітів *R. erythropolis* Au-1: вихід АСБ становив 10,1-11,7 г/дм³, клітинно-зв'язаних ТПАР – 1,4-1,7 г/дм³, позаклітинних – 2,4-2,6 г/дм³. Показано, що отримані продукти (із залишками олійних субстратів) можна застосовувати у рослинництві.

3. З використанням математичного моделювання (метод лінійних багатопараметрових рівнянь) визначено, що оптимальними екстрагентами ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 з культуральної рідини є розчинники з високою поляризуючою здатністю щодо молекул ТПАР. Розроблено нові методи виділення позаклітинних ТПАР – сорбція на натрій альгінаті або багатошарових магніточутливих композитних адсорбентах на основі оксидів перехідних металів. Найбільш раціональним сорбентом є композит з CuO – вихід ТПАР становив 0,88 г/дм³. Визначено, що ефективним й екологічно безпечним екстрагентом для трегалозоліпідних ПАР є етанол.

4. Розроблено технологію та запропоновано апаратурно-технологічну схему промислового виробництва практично цінних метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1. Технологія дає змогу максимально використати усі компоненти постферментаційної культуральної рідини та одержати 5 цільових продуктів: супернатант культуральної рідини, позаклітинні та клітинно-зв'язані трегалозоліпідні ПАР, екзополісахаридний комплекс, полігідроксиспирт.

5. Визначено фізико-хімічні і біологічні властивості продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1: висока поверхнева активність ТПАР (поверхневий натяг

35-36 мН/м, ККМ – 0,3-0,5 г/дм³), емульгування гідрофобних речовин супернатантом культуральної рідини (Е₂₄ – 35-61%) і розчинами ЕПК (Е₂₄ – 42-58%), підвищення змочування поверхонь. Показано, що ТПАР є регуляторами проникності клітинних мембран мікроорганізмів і рослин. Трегалозоліпідні ПАР є низько токсичними речовинами у порівнянні з синтетичними ПАР і рамноліпідами – цитотоксична доза становить 0,477-0,541 г/дм³.

6. Встановлено, що у композиціях з ТПАР підсилюється дія біологічно активних речовин. Розроблено препарати ТПАР з біоцидами-тіосульфонатами, в яких мінімальні інгібувальні і біоцидні концентрації тіосульфонатів знижено на 20-50%. Запропоновано комплексний регулятор росту рослин на основі індоліл-3-оцтової кислоти з ТПАР, що дозволяє зменшити дозу фітогормону у 10 разів.

7. У лабораторних та польових дослідках доведено ефективність метаболітів *R. erythropolis* Au-1 у рослинництві. Визначено раціональну концентрацію ТПАР (0,05 г/дм³) для стимулювання росту бобових і злакових рослин при допосівному обробленні насіння (надземна маса сої і пшениці зростала у середньому на 25%, а коренева – на 33% щодо контролю, урожайність культур – на 20%). Ефективним засобом допосівного оброблення насіння є СКР завдяки синергічній дії його компонентів: ТПАР, ЕПК, ауксинових фітогормонів.

8. Встановлено, що поверхнево-активні метаболіти штаму *R. erythropolis* Au-1 (СКР, ТПАР, ЕПК) є екологічно безпечними інгібіторами корозії сталі та алюмінію: в 0,1% розчині NaCl, синтетичному кислому дощі та пластовій воді ступінь захисту становив 45-97%. Розроблено синергічні інгібувальні композиції СКР з цинк фосфатом, які забезпечують високий ступінь захисту вуглецевої сталі у пластовій воді – 88-95% (патент України № 136578, 2019).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Koretska, N.I.**; Prystay, M.V.; Karpenko, E.V. Rape phosphatide concentrate in the technologies of surfactants production by the *Actinobacteria*. *Ukrainian food journal*, **2014**, 3(3), pp 429-436. *Особистий внесок: біосинтез поверхнево-активних речовин, їх виділення та властивостей, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку.* Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України № 1609 від 21.11.2013. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: Index Copernicus, Google Scholar, UlrichsWeb, Directory of Research Journals Indexing.

2. **Корецька, Н.І.**; Мідяна, Г.Г.; Карпенко, О.В. Оптимізація екстракції трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин штаму *Rhodococcus erythropolis* Au-1. *Innov Biosyst Bioeng.* **2018**, 2(4), с. 246–251. <https://doi.org/10.20535/ibb.2018.2.4.148935>. *Особистий внесок: біосинтез поверхнево-активних речовин та екстракція різними розчинниками, підготовка матеріалів до друку.* Наукове фахове видання України з технічних наук згідно

наказу МОН України № 326 від 04.04.2018. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: Index Copernicus, Google Scholar, WorldCat.

3. Похмурський, В.І.; Зінь, І.М.; Карпенко, О.В.; Покин'брод, Т.Я.; **Корецька, Н.І.**; Тимусь, М.Б.; Квятковські, Л.; Копилець, В.; Хлопик, О. Захист вуглецевої сталі інгібіторами біогенного походження. Проблеми корозії та протикорозійного захисту матеріалів. *Спецвипуск журналу "Фізико-хімічна механіка матеріалів"*, **2018**, 12, с.183-187. *Особистий внесок: біосинтез трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин*. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України № 326 від 04.04.2018. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: Google Scholar.

4. **Корецька, Н.І.**; Карпенко, О.В.; Баранов, В.І.; Лубенець, В.І.; Ногіна, Т.М. Біологічні властивості поверхнево-активних метаболітів *Rhodococcus erythropolis* Au-1 та їх перспективи для рослинництва. *Innov Biosyst Bioeng*, **2019**, 3 (2), с. 144–148. <https://doi.org/10.20535/ibb.2019.3.2.165165>. *Особистий внесок: біосинтез поверхнево-активних речовин, проведення експериментів для вивчення їх біологічних властивостей, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку*. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України № 326 від 04.04.2018. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: Index Copernicus, Google Scholar, WorldCat.

5. Zin, I. M.; Karpenko, O. V.; Pokyn'broda, T. Ya.; **Korets'ka, N. I.**; Tymus', M. B.; Kwiatkowski, L.; Kornii, S. A. Inhibition of the corrosion of carbon steels by trehalose lipid surfactants. *Materials Science*, **2019**, 54 (4), (Ukrainian Original Vol. 54, No. 4, July–August, 2018). <https://doi.org/10.1007/s11003-019-00207-0>. *Особистий внесок: біосинтез трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин*. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України № 326 від 04.04.2018. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: Google Scholar, **Scopus**, SciSearch.

6. Слободян, З. В.; Маглатюк, Л. А.; Купович, Р. Б.; **Корецька, Н. І.**; Зінь, Я. І. Вплив супернатанту культуральної рідини трегалозоліпиду на корозію сталі 20 та алюмінію в хлоридних розчинах. *Фізико-хімічна механіка матеріалів*, **2019**, 55 (5), с.27-33. *Особистий внесок: біосинтез трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин*. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України № 326 від 04.04.2018. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: Google Scholar.

7. Pokhmurs'kyi, V. I.; Zin', I. M.; Tymus', M. B.; Kornii, S. A.; Karpenko, O. V.; Khlopyk, O. P.; **Korets'ka, N. I.** Inhibition of the corrosion of carbon steel by xanthan biopolymer. *Materials Science*, 2020, 55 (4). (Ukrainian Original Vol. 55, No. 4, July–August, 2019). <https://doi.org/10.1007/s11003-020-00334-z>. *Особистий внесок: біосинтез трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин*. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України № 326 від 04.04.2018. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: Google Scholar, **Scopus**, SciSearch.

8. **Корецька, Н.І.**; Баранов, В.І.; Пристай, М.В.; Карпенко, О.В. Вплив метаболітів бактерій роду *Rhodococcus* на ростові показники проростків пшениці. *Вісник НУ «Львівська політехніка». Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. **2013**, 761, с.128-132. *Особистий внесок: проведення досліджень для вивчення впливу метаболітів бактерій роду Rhodococcus на ріст пшениці, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку*. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 09.02.2000 р. №2-02/2.

9. **Корецька, Н.І.**; Пристай, М.В.; Карпенко, О.В. Біосинтез та властивості поверхнево-активних речовин штаму *Rhodococcus erythropolis* Au-1. *Вісник НУ «Львівська політехніка». Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. **2014**, 787, с. 258-263. *Особистий внесок: біосинтез поверхнево-активних речовин, їх виділення та дослідження властивостей, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку*. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 09.02.2000 р. №2-02/2.

10. **Корецька, Н.І.**; Карпенко, І.В.; Плотникова, Т.В.; Тютюнникова, Є.М.; Мідяна, Г.Г.; Лубенець, В.І. Перспективи використання біогенних поверхнево-активних речовин та етилтіосульфанілату у технології вирощування тютюну. *Вісник НУ «Львівська політехніка». Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. **2015**, 81, с.257-261. *Особистий внесок: біосинтез трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин, підготовка матеріалів до друку*. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 09.02.2000 р. №2-02/2.

11. Карпенко, О.В.; **Корецька, Н.І.**; Щеглова, Н.С.; Карпенко, І.В.; Баранов, В.І. Стимування росту злакових рослин поверхнево-активними рамноліпідами. *Biotechnologia acta*, **2013**, 6(6), с.94-99. <https://doi.org/10.15407/biotech6.06.094>. *Особистий внесок: проведення експерименту для вивчення впливу ПАР на ріст рослин*. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: CrossRef, DOAJ, Google Scholar, InfoBase Index, Index Copernicus, Scientific Indexing Services.

12. Баня, А. Р.; Баранов, В. І.; Карпенко, І. В.; **Корецька, Н. І.**; Вільданова, Р. І.; Карпенко, О. В. Вплив біогенних поверхнево-активних речовин і мікробного препарату на морфометричні показники проростків *Raphanus sativus* L. і *Pisum arvense* L. *Біологічні студії*. **2013**, 7 (1), с.115-122. *Особистий внесок: біосинтез трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин*. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: CrossRef, DOAJ, Google Scholar, J-gate, Open access.

13. Патент України на корисну модель № 136578 від 27.08.2019. Інгібіторна композиція. Зінь, І.М.; Похмурський, В.І.; Карпенко, О.В.; Слободян, З.В.; Тимусь, М.Б.; Корній, С.А.; Хлопик, О.П.; **Корецька, Н.І.**; Покинсьброда, Т.Я.; Ногіна, Т.М.; Хоменко, Л.А.

14. **Корецька, Н.І.**; Карпенко, О.В.; Пристай, М.В.; Щеглова, Н.С. Дія мікробних поверхнево-активних речовин на проростання насіння деяких видів сільськогосподарських рослин. *Збірник тез V Міжнародної наукової*

конференції "Молодь та поступ біології", 12-15 травня 2009 року, м. Львів. Т. 2, с 203.

15. **Корецька, Н.І.**; Карпенко, О.В.; Пристай, М.В.; Баранов, В.І. Рістстимулюючі препарати для рослин на основі метаболітів бактерій роду *Gordonia* та *Rhodococcus*. *Матеріали IX міжнародної конференції «daRostim: Фітогормони, гумінові речовини та інші біологічно-активні сполуки для сільського господарства, здоров'я людини і охорони навколишнього середовища»*, 7-10 жовтня 2013, Львів, с.66.

16. **Корецька, Н.І.**; Карпенко, О.В.; Баранов, В.І. Вплив препарату трегалозоліпідів на поглинання калію та кальцію проростками сої та пшениці. *Матеріали наукової конференції «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку»*, 12-15 вересня 2013р, Шацьк. с. 38.

17. **Корецька, Н.І.**; Карпенко, О.В.; Баранов, В.І. Вплив продуктів метаболізму бактерій роду *Rhodococcus* на схожість і морфометричні показники проростків пшениці. *Збірник тез IX Міжнародної наукової конференції "Молодь та поступ біології"* (16-19 квітня 2013р.), с.306.

18. **Корецька, Н.І.**; Карпенко, О.В.; Баранов, В.І.; Карпенко, І.В. Трегалозоліпіди як ефективний препарат для стимулювання росту, підвищення врожайності та захисту пшениці. *Матеріали наукової конференції «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку»*. 11-14 вересня 2014р., Шацьк. с.45.

19. **Корецька, Н.І.**; Карпенко, О.І.; Пристай, М.В.; Баранов, В.І. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин штамом *Rhodococcus erythropolis* Au-1 та перспективи їх використання як регуляторів росту рослин. *Збірник тез X Міжнародної наукової конференції "Молодь та поступ біології"* (8-11 квітня 2014р.), с.177-178.

20. Плотникова, Т.В.; Тютюнникова, Е.М.; Карпенко, І.В.; **Корецька, Н.І.**; Лубенець, В.І. Результати испытаний биологически активных веществ при возделывании табака.: *Материалы XI междунар. науч.-практ. конф. «daRostim: Теория, практика и перспективы применения биологически активных соединений в сельском хозяйстве»*. 17-19 червня 2015. Сыктывкар, Россия. с. 135-136.

21. Швець, В.В.; Карпенко, О.В.; **Корецька, Н.І.**; Новіков, В.П.; Лубенець, В.І. Нові біоцидні препарати на основі тіосульфонатів та трегалозоліпідних ПАР проти фітопатогенних мікроорганізмів. *I Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Науково-практичні засади загальноінженерної підготовки фахівців фармації»*. 25-26 жовтня 2018 р., м. Харків. с. 264-267.

22. Kuntiyi, O.; Kytsya, A.; Karpenko, E.; Bondarenko, A.; Mazur, A.; Bazylyak, L.; **Koretska, N.**; Zayarnyuk, A. Synthesis of silver nanoparticles by contact glow discharge electrolysis in sodium polyacrylate (NaPa) solutions. *7-ма міжнародна конференція «Нанотехнології та наноматеріали»*. 27-30 серпня 2019 р. м.Львів.

АНОТАЦІЯ

Корецька Н.І. Біотехнологія поверхнево-активних продуктів штаму *Rhodococcus erythropolis* AU-1, властивості та застосування. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, Київ, 2020.

Дисертація присвячена дослідженню процесів біосинтезу ПАР актинобактерій *Rhodococcus erythropolis* Au-1 (*R. erythropolis* УКМ Ас-603), вивченню фізико-хімічних і біологічних властивостей біоПАР та їх практичного застосування. Визначено раціональний склад поживного середовища та доцільність застосування в якості субстрату відходів олійної промисловості. Проведено апробацію синтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 у біореакторі з вихровою системою аерації. Підібрано ефективні розчинники для екстракції ТПАР з постферментаційної культуральної рідини та біомаси бактерій. Запропоновано нові методи виділення позаклітинних ТПАР з використанням натрій альгінату або магніточутливих багат шарових композитних адсорбентів типу «ядро-оболонка» на основі оксидів перехідних металів. Вперше виділено клітинний біополімер, який ідентифіковано як полігідроксиполімер. Розроблено технологію промислового виробництва практично цінних метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1, яка дозволяє максимально використати усі компоненти постферментаційної культуральної рідини. Вивчено фізико-хімічні та біологічні властивості поверхнево-активних продуктів *R. erythropolis* Au-1. Доведено можливість їх практичного застосування у рослинництві та в якості екологічно безпечних інгібіторів корозії металів.

Ключові слова: біоПАР, *Rhodococcus erythropolis*, трегалозоліпіди, фізико-хімічні і біологічні властивості, стимулятори росту рослин, інгібітори корозії.

АННОТАЦИЯ

Корецкая Н.И. Биотехнология поверхностно-активных продуктов *Rhodococcus erythropolis* Au-1, свойства и применение. - На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского» МОН Украины», Киев, 2020.

Диссертация посвящена исследованию процессов биосинтеза ПАВ актинобактерий *Rhodococcus erythropolis* Au-1 (*R. erythropolis* УКМ Ас-603), изучению физико-химических и биологических свойств биоПАВ, а также технологий их практического применения. Определен рациональный состав питательной среды, установлена целесообразность применения отходов масложировой промышленности для синтеза ТПАВ. Проведена апробация синтеза ТПАВ штамма *R. erythropolis* Au-1 в биореакторе с вихревой системой аэрации. Подобраны эффективные растворители для экстракции ТПАВ из

постферментационной культуральной жидкости и биомассы бактерий. Предложены новые способы выделения внеклеточных ПАВ с использованием натрий альгината или многослойных композитных адсорбентов типа «ядро-оболочка» на основе оксидов переходных металлов. Впервые выделен клеточный биополимер *R. erythropolis* Au-1, идентифицированный как полигидроксиалканоксид. Разработана технология промышленного производства практически ценных метаболитов штамма *R. erythropolis* Au-1, которая позволяет максимально использовать все компоненты постферментационной культуральной жидкости. Охарактеризованы физико-химические и биологические свойства ПАВ *R. erythropolis* Au-1. Предложены технологии их практического применения в растениеводстве и в качестве экологически безопасных ингибиторов коррозии металлов.

Ключевые слова: биоПАВ, *Rhodococcus erythropolis*, трегалозолипиды, физико-химические и биологические свойства, стимуляторы роста растений, ингибиторы коррозии.

SUMMARY

Koretska N.I. Biotechnology, characteristics and application of metabolites of the strain *Rhodococcus erythropolis* Au-1. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

Dissertation for the candidate of technical science degree in speciality 03.00.20 - Biotechnology. – National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute” of the Ministry of Education and Science of Ukraine. Kyiv, 2020.

Surfactants are widely used in modern industry, agriculture, environmental restoration, medicine, however, synthetic surfactants are environmentally hazardous substances. Advantages of products of microbial synthesis (biosurfactants) – high efficiency, stability in various temperatures and pH, biological activity, as well as biodegradability and low toxicity.

The aim of the work is the development of biotechnology of surface-active substances of *R. erythropolis* Au-1 via optimizing the cultivation conditions and isolation, studying physico-chemical, biological properties of the products, determine of their practical potential.

The strain *R. erythropolis* Au-1 (*R. erythropolis* UCM Ac-603) is a promising producer of cell-bound and extracellular trehalose lipid surfactants, exopolysaccharides, cell polymers. The rational composition of the nutrient medium has been determined: hexadecane – 20 g/dm³, sodium nitrate – 3 g/dm³. The cultivation of bacteria *R. erythropolis* Au-1 for trehalose lipid surfactants synthesis has been carried out in a bioreactor with vortex aeration system (the yield of the target products increased by 41-50%). The possibility of waste vegetable oil using (phosphatide concentrate, oil sludge, waste frying sunflower oil) for the synthesis of trehalose lipid surfactants of *R. erythropolis* Au-1 has been established.

New approaches of extracellular trehalose lipids isolation with adsorbents were developed: sodium alginate or multilayer metal oxides based composite adsorbents (MnO, CoO, CuO). The use of ethanol for extraction of cell-bound trehalose lipid surfactants was justified (yield 0.29 g from 1 g biomass).

For the first time biodegradable polymer from bacteria cells of *R. erythropolis* Au-1 was obtained. It has been identified as the polyhydroxyalkanoate, its melting point – 42°C, thermal stability – up to 175°C.

The ability of the *R. erythropolis* Au-1 strain to synthesize the phytohormones has been established.

Physico-chemical and biological properties of the metabolites of *Rhodococcus erythropolis* strain Au-1 were established: high surface activity, emulsification of hydrophobic substances, wetting of surfaces as well as the influence on the permeability of cell membranes of microorganisms and plants, on the auxin phytohormones activity. The antimicrobial activity of surfactants against phytopathogen bacteria and fungi was shown. The highly effective formulations of trehalose lipid surfactants with thiosulfonates-biocides were designed. The biological properties of trehalose lipid surfactants were established: increase the permeability of bacteria cell membranes (by 6-18%), adsorption of mineral elements by plants (by 27-48%), stimulate plant growth (by 20-36%). It has been shown that trehalose lipid surfactants promote the action of other biologically active substances, in particular, biocide-thiosulfonates (by 20-50%) and phytohormones – indolyl-acetic acid (almost 10 times). It was found, that trehalose lipid surfactants are less toxic than synthetic and some biogenic surfactants.

It have been substantiated that the cultural liquid supernatant (CLS) of *R. erythropolis* Au-1 is an effective and economically available plant growth regulator. Using the trehalose lipid surfactants increase the yield of legumes and cereals by an average of 20%. So, the possibility of practical use of metabolites in crop production has been proved.

The surface-active substances of the strain are environmentally friendly corrosion inhibitors of steel and aluminum alloy. The effective compositive inhibitor based on CLS of *R. erythropolis* Au-1 and zinc phosphate has been developed (patent of Ukraine № 136578, 2019): the degree of carbon steel protection from corrosion is 88-95%.

The technology process, the flow and equipment diagrams for the industrial production of the biosurfactants of *R. erythropolis* Au-1 have been developed. This technology allows maximum use of all components of post-fermentation culture liquid. It is possible to obtain 5 commercial forms: the culture liquid supernatant, extracellular and cell-bound trehalose lipid surfactants, exopolysacharides, cell polyhydroxyalkanoate. The results have ecological and economic advantages.

On the topic of the thesis, 22 works were published, among them: 12 scientific articles, including 7 articles indexed in Scopus, Google Scholar, 1 patent of Ukraine, 9 proceeding of conferences.

Key words: biosurfactants, *Rhodococcus erythropolis*, trehalose lipids, physico-chemical and biological properties, corrosion inhibitors, plant growth regulators.